果 树 学 报 2023,40(9):1789-1799
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20230044

苹果*PIN*家族基因鉴定及在不定根形成中的表达分析

方 森,宋雪莲#,韩轩轩,宋春晖,焦 健,王苗苗,宋尚伟,郑先波*,白团辉*

(河南农业大学园艺学院,郑州 450046)

摘 要:【目的】探究苹果*PIN*全基因组特征及在不定根形成过程中的表达分析,以便更深入地了解其结构特点与潜在功能,为研究不定根形成的分子机制奠定基础。**【方法】**利用苹果基因组数据库GDR和HMMER对苹果*PIN*基因家族成员进行鉴定并编号,用MEGA、TBtools和MEME等生物信息学软件对其家族成员的基因定位、系统进化关系、基因结构、保守motif基序和蛋白保守结构域等进行分析,并采用qRT-PCR方法对*PIN*基因家族成员在不定根形成中的表达模式进行分析。**【结果】**苹果*PIN*基因家族有13个成员,分布于基因组8条染色体上,氨基酸数目在357~660个之间,蛋白质分子质量为38.84~71.61 ku,等电点在6.93~9.35之间。启动子作用元件分析表明,13个*PIN*启动子上含有响应激素、生长发育和逆境相关的顺式作用元件,其中有8个*PIN*基因含有生长素响应作用元件,暗示他们可能参与生长素调控不定根形成。转录组分析显示,13个*PIN*家族成员中,有6个基因(*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN6*、*MdPIN7*、*MdPIN11*和*MdPIN12*)在吲哚丁酸(IBA)处理下表达上调。进一步通过qRT-PCR分析,发现*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN6*和*MdPIN11*在IBA处理下都有明显上升趋势,其中*MdPIN4*表达量变化最大。**【结论】**通过对苹果全基因组进行分析,共鉴定到13个*PIN*基因,分布在8条染色体上,通过转录组和qRT-PCR分析,推测*MdPIN4*可能在调控苹果砧木不定根形成中起着重要作用。

关键词:苹果;*PIN*;全基因组鉴定;不定根形成;基因表达分析

中图分类号:S661.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2023)09-1789-11

Identification and expression analysis of *PIN* gene family during adventitious root formation in apple

FANG Sen, SONG Xuelian#, HAN Xuanxuan, SONG Chunhui, JIAO Jian, WANG Miaomiao, SONG Shangwei, ZHENG Xianbo*, BAI Tuanhui*

(College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract:【Objective】Apple (*Malus*×*domestica* Borkh.) is one of the most economically important tree fruits in China, and the intensive cultivation with dwarfing rootstock is popular in the world. The use of dwarfing rootstocks is the main way to realize the intensive cultivation of apple. The formation of adventitious roots is one of the key steps in the vegetative propagation of dwarfing rootstocks. The auxin transporter PIN-FORMED (PIN) protein is a typical transmembrane transport protein, which plays an important role in adventitious root formation by participating in the polar transport of auxin in plants. In this study, the characteristics of the apple *PIN* gene family at the whole genome and its expression in the process of adventitious root formation were investigated, so as to better understand its structural characteristics and potential functions, and lay a foundation for studying the molecular mechanism of adventitious root formation. 【Methods】 The apple *PIN* gene family members were identified using the apple genome database GDR and HMMER. The gene mapping, phylogenetic relationship, gene structure, conserved motif analysis and protein conserved domain of the *PIN* gene family members were analyzed using bioinformatics software such as MEGA, TBtools and MEME. qRT-PCR was used to ana-

收稿日期:2023-02-20 **接受日期:**2023-05-22

基金项目:国家重点研发计划(2019YFD1000100、2018YFD1000300);国家自然科学基金(31872058);河南省科技攻关项目(222102110041);河南省大宗水果产业技术体系(ARRS-22-09-Z2)

作者简介:方森,男,在读硕士研究生,研究方向为果树逆境分子生物学。Tel:18838151770,E-mail:fangsen2020@163.com。#为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0371-56552762,E-mail:xianboz@163.com;Tel:0371-63579623,E-mail:tuanhuibai88@163.com

lyze the expression pattern of the *PIN* gene family members in adventitious root formation.【Results】There were 13 members of the apple *PIN* gene family, and they were distributed on 8 chromosomes. The amino acid lengths ranged from 357 to 660 aa, the molecular weights of protein ranged from 38.84 to 71.61 ku, and the isoelectric points ranged from 6.93 to 9.35. The sequence analysis showed the 13 *PIN* genes were unevenly distributed on 8 chromosomes of apple (Chr 4, Chr 6, Chr 9, Chr 10, Chr 12, Chr 13, Chr 14 and Chr 16), among which there were two *PIN* genes on Chr 4, 12, 13, 14 and 16 respectively, there was only one *PIN* gene on Chr 6, 9 and 10. The collinear analysis showed that there was segment replication between the *MdPIN2* and the *MdPIN7*, the *MdPIN3* and the *MdPIN11*, the *MdPIN6* and the *MdPIN10*, the *MdPIN8* and the *MdPIN12*, and the *MdPIN9* and the *MdPIN13*, and no tandem duplication was found, suggesting that gene segment replication was the main driving force for the amplification of this family. The apple *PIN* genes contained multiple introns and exons, and the structures were relatively complex. The conserved motifs analysis showed that the *MdPIN1*, *MdPIN2*, *MdPIN4* and *MdPIN7* had 8 conserved motifs, and all the other genes had 10 conserved motifs. In order to study the evolutionary relationships of the members of the *PIN* gene family, MEGA software was used to conduct phylogenetic analysis of the apple *PIN* family was mainly distributed in the G1 and G3 subfamilies, with 10 in the G3 subfamily, three in the G1 subfamily. The analysis of promoter-acting elements showed that 13 *PIN* promoters contained cis-acting elements related to hormone, growth and stress response, and 8 of them contained auxin response elements, suggesting that they might be involved in auxin regulation. The transcriptome analysis showed that the expression levels of the *MdPIN3*, *MdPIN4*, *MdPIN5*, *MdPIN6*, *MdPIN8*, *MdPIN10*, *MdPIN11* and *MdPIN12* under IBA treatment were higher than those of the control. There was no change in the *MdPIN1* and *MdPIN13* compared with the control, while the expression of the *MdPIN7* was lower than that of the control under IBA treatment. Six genes with significantly different expressions (the *MdPIN3*, *MdPIN4*, *MdPIN6*, *MdPIN7*, *MdPIN11* and *MdPIN12*) were screened and their dynamic expression patterns in adventitious root formation were further verified by qRT-PCR. The expression of the *MdPIN3*, *MdPIN4*, *MdPIN6* and *MdPIN11* was significantly induced by IBA treatment, which was consistent with the results of the transcriptome. The expression level of the *MdPIN3* and *MdPIN4* was the highest on the 5th day, the expression level of the *MdPIN4* was 2.9 times as high as that of the control on the 5th day, and the expression level of the *MdPIN6* was the highest on the 10th day.【Conclusion】A total of 13 *PIN* genes in apple were identified and they were distributed on 8 chromosomes. The transcriptome and qRT-PCR analysis suggested that the *MdPIN4* might play an important role in regulating the adventitious root formation of apple rootstocks. These findings might lay a foundation to functionally characterize the *MdPIN* genes to unravel their exact role in adventitious root formation in apple.

Key words: Apple; *PIN*; Genome-wide identification; Adventitious root formation; Gene expression analysis

苹果（*Malus*×*domestica* Borkh.）是我国主要栽培果树树种之一，其面积和产量均居世界首位。矮砧集约栽培是世界苹果发展的方向和趋势，利用矮化砧木是实现苹果矮砧密植集约栽培的主要途径之一[1]。不定根形成是苹果无性系矮化砧木繁育的关键环节。生长素在植物不定根形成中发挥重要作用。生长素外向转运体PIN（PIN-FORMED）蛋白是一种典型的跨膜运输蛋白，通过参与植物体内生长素的极性运输进而在植物不定根形成过程中发挥重要作用[2-3]。笔者在本研究中对苹果*PIN*进行全基因组鉴定，并对其家族成员的理化性质、基因结构及其在不定根形成过程中的表达模式进行分析，旨在挖掘调控苹果不定根形成的关键基因。

PIN蛋白是作用于植物信号分子的一种生长素

转运蛋白，通过参与植物体内生长素的极性运输进而在不同程度上行使特殊的功能，在植物生长发育过程中起重要作用，包括胚胎发育、组织分化和器官形成等[4-5]。随着测序技术的快速发展，越来越多的物种进行了*PIN*基因家族的鉴定，其中拟南芥8个[6]，水稻12个[7]，烟草29个[8]，玉米14个[9]，棉花17个[10]，辣椒10个[11]，杨树15个[12]，大豆23个[13]，番茄10个[14]。一些*PIN*基因已被证实在植物生根过程中发挥重要作用[15]。Lee等[16]研究表明，*PIN8*主要在拟南芥萌发阶段发挥功能，*PIN8*功能缺失和突变显著降低了拟南芥侧根的数量。Yuan等[17]研究发现*HAT2*基因通过直接抑制*PIN3*转录，调节拟南芥根系生长。在水稻中，*OsPIN1*与同源基因共同调控水稻主根、侧根和不定根的形成与生长[18]。据报道，*PmPIN1*在桑树幼根中表达量高，将该基因转入烟草发现转基因植株发根量较对照多，表明*PIN1*基因有利于根原基的形成和新根的生长[19]。在棉花中发现*PIN1-3*和*PIN2*参与棉花根系的发育，在棉花主根和侧根形成中发挥重要作用[10]。目前，已有几个苹果*PIN*基因被克隆分离出来，并证实它们在苹果矮化和腋芽萌发过程中发挥重要作用[20-21]。Zhang等[20]分离出了苹果*PIN9*基因，表明其在苹果砧木矮化中起重要作用。刘小杰等[21]研究表明，*MdPIN15*对苹果腋芽萌发起重要作用。许多植物*PIN*家族基因已经被鉴定，并证实一些*PIN*家族成员在植物不定根形成过程中发挥重要作用，但目前苹果*PIN*家族成员在不定根形成方面的具体功能尚不清楚。笔者在本研究中通过对苹果全基因组*PIN*基因家族进行鉴定和生物信息学分析，结合转录组和qRT-PCR分析，深入了解其结构特点与潜在功能，为后续进行苹果*PIN*基因的功能验证和不定根形成的分子机制解析奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料培养与处理

试验材料为苹果砧木M26组培苗。培养条件：温度为(25±2)℃，光周期为14 h(L)/10 h(D)，光照度为2500~2800 lx，相对湿度为70%~80%。

将继代培养1个月生长一致的M26组培苗随机分成2组。第一组(对照，CK)，在MS培养基上培养；第二组(IBA)，在MS + 0.6 mg·L^{-1}IBA的培养基上培养。每组设3个重复，每个重复30个组培苗。每组分别在培养后第0、1、3、5、10、15天取茎基部0.5 cm左右的茎段，液氮速冻，−80 ℃保存备用。

1.2　苹果*PIN*家族成员鉴定与分析

通过GDR数据(https://www.rosaceae.org/)获得苹果基因组序列，从TAIR(https://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/index.jsp)下载拟南芥PIN成员蛋白序列，以8个拟南芥序列作为查询序列，用苹果全部蛋白序列为库，进行Blastp搜索，使用HMMER和SMART网站进行蛋白质的保守结构域双重验证，最终得到13个苹果PIN家族成员，然后以染色体位置信息进行编号和命名。采用ExPASy(https://www.expasy.org/)分析苹果*PIN*基因家族氨基酸数量(aa)、蛋白质分子质量(ku)和等电点(pI)等理化性状[22]。通过在线工具(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对苹果*PIN*基因家族蛋白二级结构预测进行分析。用TBtools软件对苹果基因组信息和基因结构注释文件进行分析[23]，对提取到的13个苹果*PIN*基因进行基因结构的可视化展示，获得基因的内含子和外显子的个数以及排布情况。采用MEME4.9软件(http://meme-suite.org/tools/meme)进行蛋白motif基序分析。从相应网站下载苹果、拟南芥、番茄、玉米和桃*PIN*基因家族的蛋白氨基酸序列，利用MEGA-X软件采用邻接法(neighbor-joining，NJ)构建系统进化树，参数Bootstrap值设为1000。通过EvolView(https://www.evolgenius.info/evolview/)对进化树进行美化[24]。提取苹果*PIN*家族基因上游2000 bp的序列作为启动子序列，通过Plantcare(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)数据库对苹果*PIN*家族基因进行顺式作用元件在线分析[25]。

1.3　转录组分析

根据IBA处理M26组培苗的不定根生长情况(图1)和以前的研究结果[2]，选取对照和IBA处理5 d的M26组培苗茎基部，使用液氮速冻保存。由北京百迈客生物科技有限公司在Illumina HiSeq 4000高通量平台进行转录组测序，过滤低质量reads和不合格序列后，完整Reads使用HISAT2与苹果基因组(GDDH13 Version 1.1，https://iris.angers.inra.fr/gddh13/the- apple- genome- downloads.html)进行比对。使用TBtools绘制*PIN*基因家族表达热图。

1.4　qRT-PCR分析

使用植物总RNA抽提纯化试剂盒(huayueyang

图 1 IBA 处理对苹果砧木不定根形成的影响

Fig. 1 Effect of different IBA on adventitious root formation in apple

biotech，中国）提取 M26 苹果茎基部 RNA。使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒[宝生物工程（大连）有限公司]对 RNA 进行反转录获得 cDNA。通过苹果基因组数据库 GDR（https://www.rosaceae.org/）下载苹果 PIN 蛋白基因家族的 CDS 序列，利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物，内参基因选用 *Actin*，序列见表 1。反应体系为 20 μL：10 μL ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix（南京诺唯赞生物科技股份有限公司），1 μL cDNA 模板，上、下游引物（10 μmol·L^{-1}）各 1 μL，7 μL 无菌蒸馏水。运行程序：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 3 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 10 s，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因的相对表达量[26]。用 SPSS 软件的单因素 LSD 法进行差异显著性分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	正向引物序列（5’−3’） Forward primer sequence (5’−3’)	反向引物序列（5’−3’） Reverse primer sequence (5’−3’)
MdPIN3	F：CACGGCGGACAGAATAATGC	R：ATTAGCGGTGACGGTTCTGG
MdPIN4	F：TCCAATGCTGATCTGGTCGC	R：CAGCTGTGTTGGAAAGGGGA
MdPIN6	F：AGACAATCGCACTACGGCAA	R：GTTTCTTCTTGGCTCCGGCA
MdPIN7	F：CTGTATTGCTGTGGGCTTGC	R：TGGATTGTGGTAATGCTGCC
MdPIN11	F：AAATCAAACGCTTCGCGGTC	R：TCCGTGTGGTTAAAGCTCGAT
MdPIN12	F：GGCGGAAGCTTATCCGTAAC	R：CCCACATGCCACCGGAAAG
Actin	F：GGATTTGCTGGTGATGATGCT	R：AGTTGCTCACTATGCCGTGC

2 结果与分析

2.1 苹果 *PIN* 家族基因全基因组鉴定

将拟南芥中 *PIN* 基因家族的蛋白序列在苹果基因组中进行比对，确定苹果 *PIN* 有 13 个成员，根据其在染色体的位置命名为 *MdPIN1*~*MdPIN13*（图 2）。对鉴定到的 13 个苹果 *PIN* 基因进行理化性质分析（表 2）。氨基酸数目在 357~660 个之间，蛋白质分子质量为 38.84~71.61 ku，其中 *MdPIN4* 分子质量最小，*MdPIN8* 分子质量最大，等电点在 6.93~9.35 之间，该家族的亚细胞定位预测均位于质膜上。通过苹果 PIN 蛋白的二级结构预测分析，发现苹果 PIN 蛋白以 *α*-螺旋和不规则卷曲为主（表 3）。其中 *α*-螺旋含量为 28.79%~55.99%，*β*-转角含量为 4.15%~5.85%，延伸链含量为 13.69%~16.16%，不规则卷曲含量为 24.79%~52.62%。

2.2 苹果 *PIN* 基因家族成员染色体定位和共线性分析

通过序列分析，13 个基因不均匀分布在苹果的 8 条染色体上（Chr 4、Chr 6、Chr 9、Chr 10、Chr 12、Chr 13、Chr 14 和 Chr 16），其中 4 号、12 号、13 号、14

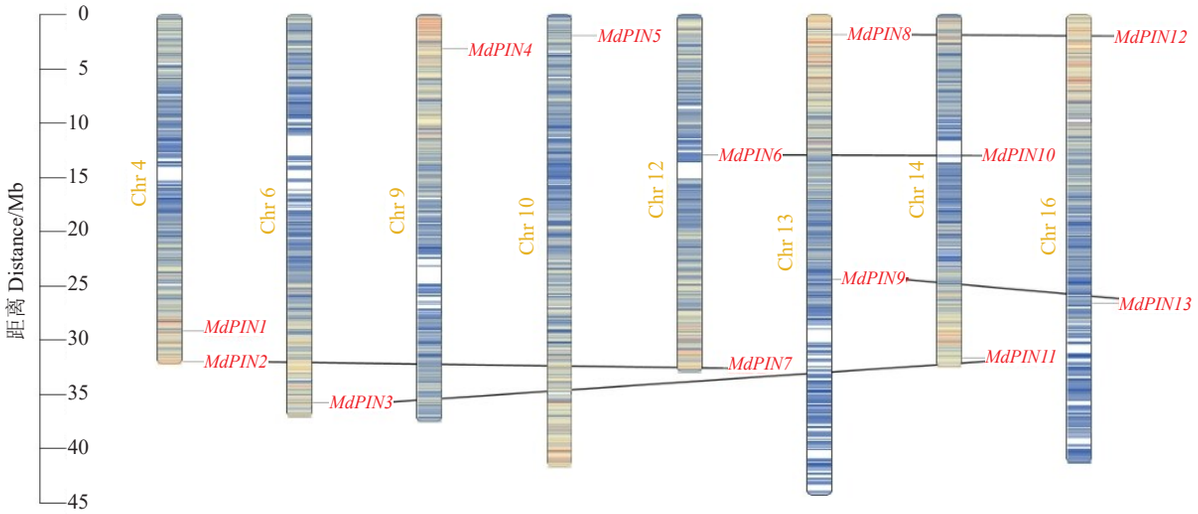

图 2　苹果 *PIN* 家族成员在染色体上的定位与共线性分析

Fig. 2　Chromosome location and collinearity analysis of apple *PIN* gene family

表 2　苹果 *PIN* 基因家族理化性质

Table 2　Physical and chemical properties of *PIN* gene family in apple

基因名称 Gene name	序列 ID Sequence ID	染色体 Chr	基因组位置 Genomic location	氨基酸数量 Amino acid number	蛋白质分子质量 Molecular mass/ku	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular localization
MdPIN1	MD04G1205100	4	29 117 091~29 119 535	359	39.56	7.67	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN2	MD04G1243800	4	32 009 981~32 012 779	359	39.51	8.72	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN3	MD06G1226800	6	35 755 661~35 759 407	620	67.58	9.11	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN4	MD09G1047300	9	3 099 049~3 101 173	357	38.84	9.35	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN5	MD10G1014300	10	1 940 045~1 946 697	551	60.29	8.79	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN6	MD12G1095100	12	12 916 524~12 919 513	598	64.36	9.10	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN7	MD12G1259500	12	32 595 788~32 598 440	359	39.48	7.60	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN8	MD13G1025300	13	1 786 086~1 792 173	660	71.61	8.20	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN9	MD13G1239200	13	24 345 236~24 349 901	653	70.22	9.33	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN10	MD14G1090900	14	12 984 459~12 988 104	599	64.64	9.10	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN11	MD14G1236300	14	31 637 123~31 640 825	622	67.76	8.97	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN12	MD16G1027900	16	1 969 784~1 974 751	636	69.02	6.93	细胞膜 Plasma membrane
MdPIN13	MD16G1244500	16	26 616 630~26 620 097	650	70.22	9.12	细胞膜 Plasma membrane

号和16号染色体上分别有2个，6号、9号和10号染色体上只有1个（图2）。共线性分析发现，*MdPIN2*和*MdPIN7*、*MdPIN3*和*MdPIN11*、*MdPIN6*和*MdPIN10*、*MdPIN8*和*MdPIN12*、*MdPIN9*和*MdPIN13*之间存在基因片段复制，没有发现串联重复，说明基因片段复制是该家族扩增的主要动力。

2.3　苹果 *PIN* 基因家族成员保守序列、基因结构和系统发育分析

苹果*PIN*基因都含有多个内含子和外显子，结构比较复杂。保守基序分析表明，13个苹果*PIN*基因的保守基序数量比较一致，除了*MdPIN1*、*MdPIN2*、*MdPIN4*和*MdPIN7*保守基序有8个，其他基因的保守基序都是10个（图3）。为了研究*PIN*基因家族的进化关系，使用MEGA软件对苹果、拟南芥、番茄、玉米和桃中鉴定出的家族成员进行系统进化分析。结果显示，这5个物种的PIN家族成员分成3个亚家族（G1，G2和G3），其中G1亚家族中有10个PIN成员，G2亚家族中有9个PIN成员，G3亚家族中有41个PIN成员。苹果PIN家族主要分布在G1和G3亚家族，G3亚家族有10个，G1亚家族有3个，G2亚家族没有苹果PIN（图4）。

2.4　苹果 *PIN* 基因家族成员顺式作用元件分析

为了研究苹果*PIN*基因家族对激素的响应，对苹果*PIN*转录起始位置上游2000 bp的序列的顺式作用

表3 苹果PIN蛋白的二级结构预测

Table 3 Predicted secondary structure of the apple PIN protein

蛋白名称 Protein name	比例 Proportion/%			
	α-螺旋 α-helix	β-转角 β-turn	延伸链 Extended strand	不规则卷曲 Random coil
MdPIN1	51.53	5.85	15.88	26.74
MdPIN2	55.99	4.46	14.76	24.79
MdPIN3	29.68	5.16	15.16	50.00
MdPIN4	51.26	4.76	14.85	29.13
MdPIN5	33.76	4.90	15.25	46.10
MdPIN6	32.11	4.52	14.72	48.66
MdPIN7	52.65	4.74	16.16	26.46
MdPIN8	29.70	5.15	13.94	51.21
MdPIN9	28.79	4.44	14.70	52.07
MdPIN10	30.05	5.51	15.19	49.25
MdPIN11	30.55	4.50	14.79	50.16
MdPIN12	30.19	4.87	15.25	49.69
MdPIN13	29.54	4.15	13.69	52.62

元件进行预测和分析。发现响应茉莉酸甲酯和脱落酸的顺式作用元件较多，分别有38个和28个（图5）。在苹果*PIN*基因13个家族成员中，*MdPIN1*响应茉莉酸甲酯的顺式作用元件最多，有12个；*MdPIN1*、*MdPIN2*和*MdPIN8*启动子响应脱落酸的顺式作用元件最多，均为5个。响应赤霉素的顺式作用元件有15个，主要分布在*MdPIN2*、*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN5*、*MdPIN8*、*MdPIN9*、*MdPIN10*和*MdPIN11*基因启动子上。响应水杨酸的顺式作用元件有19个，主要分布在*MdPIN3*、*MdPIN6*、*MdPIN7*、*MdPIN8*、*MdPIN9*和*MdPIN10*基因启动子上。响应生长素的顺式作用元件有8个，分别在*MdPIN1*、*MdPIN2*、*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN9*、*MdPIN10*和*MdPIN12*基因启动子上。

2.5 苹果*PIN*基因家族成员在IBA处理下的转录组分析

多个苹果*PIN*基因家族成员在对照组和IBA处理组的表达量差异较大。*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN5*、*MdPIN6*、*MdPIN8*、*MdPIN10*、*MdPIN11*和*MdPIN12*在IBA处理下表达量较对照高，*MdPIN1*和*MdPIN13*与对照相比没有变化，而*MdPIN7*在IBA处理下表达量比对照低（图6）。笔者推测，高表达的*PIN*基因家族成员可能响应IBA处理并在苹果不定根形成过程中发挥作用。

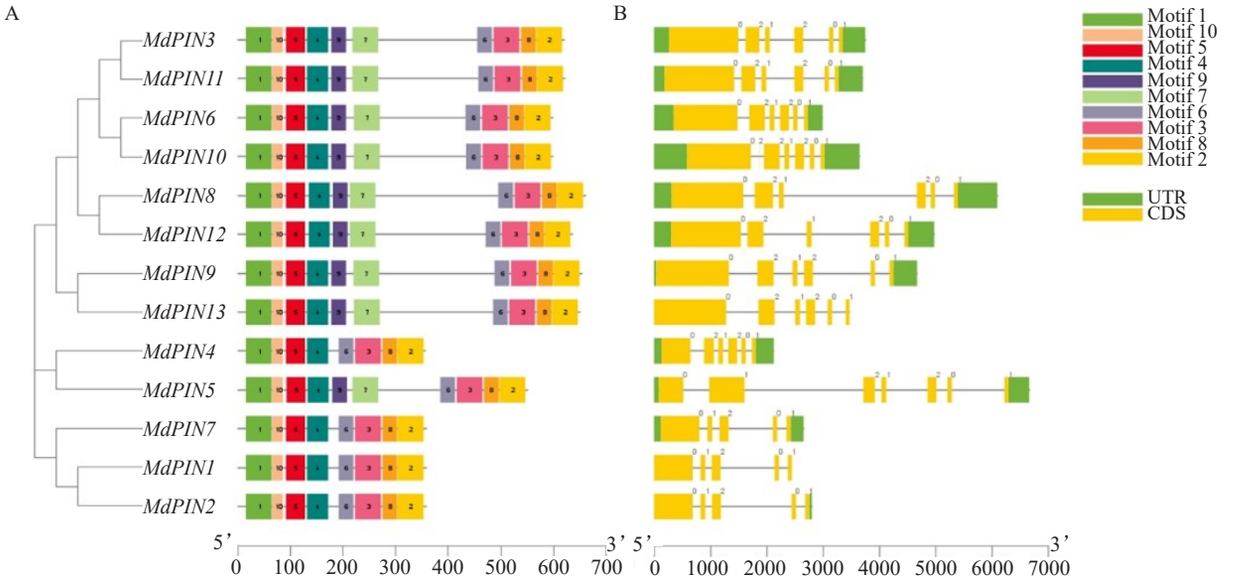

图3 苹果*PIN*基因家族保守基序（A）和基因结构（B）分析

Fig. 3 Conserved motifs (A) and gene structure (B) analysis of apple *PIN* gene family

2.6 苹果*PIN*基因家族成员在IBA处理下的表达分析

为了进一步筛选调控不定根相关的基因，从转录组中筛选表达差异较大的6个基因（*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN6*、*MdPIN7*、*MdPIN11*和*MdPIN12*），采用qRT-PCR分析了这6个基因在IBA处理0、1、3、5、10、15 d的动态表达模式（图7）。发现IBA处理显著诱导*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN6*、*MdPIN11*的表达，与转录组的结果一致。其中*MdPIN3*和*MdPIN4*在第5天时表达量最高，*MdPIN4*在第5天的表达量是对照的2.9倍，*MdPIN6*在10 d时表达量最高，揭示这

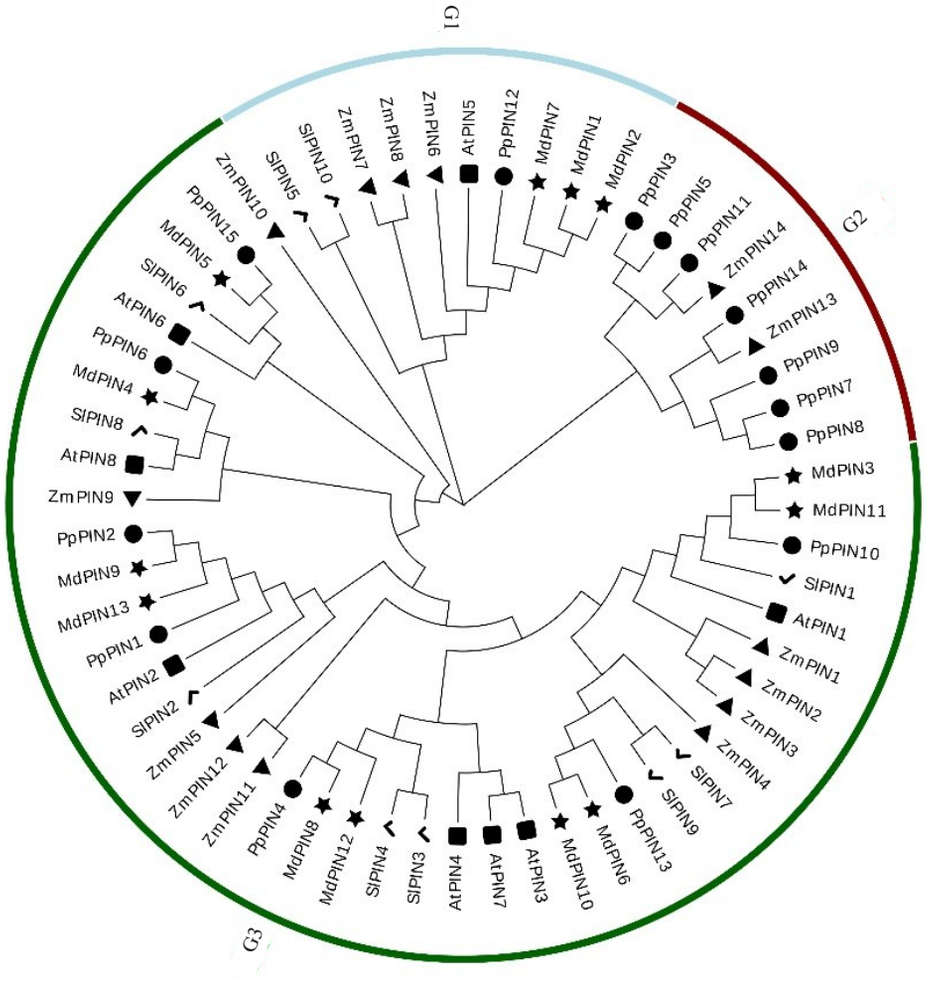

图 4　苹果、拟南芥、番茄、玉米和桃 PIN 蛋白的系统进化分析

Fig. 4　Phylogenetic analysis of PIN protein in apple, *Arabidopsis*, tomato, maize and peach

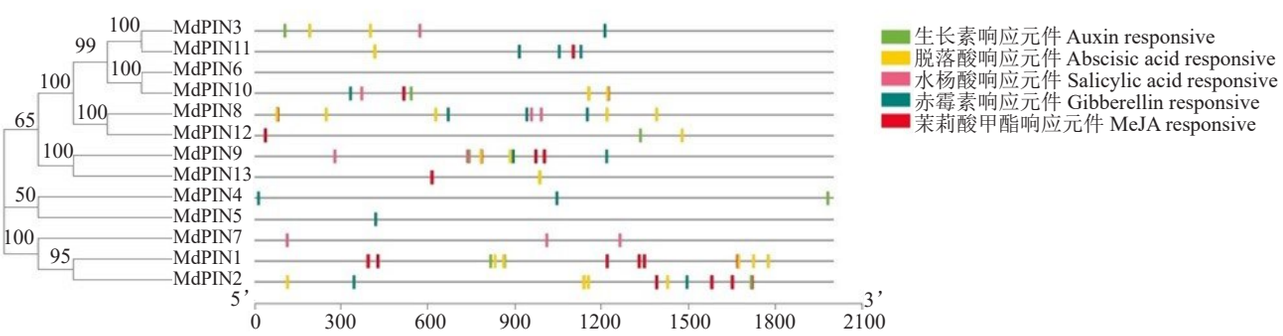

图 5　苹果 *PIN* 基因家族成员启动子的顺式作用元件分析

Fig. 5　*Cis*-element analysis of apple *PIN* gene promoters

些基因可能在不定根形成过程中起重要作用。而*MdPIN12*在IBA处理下表达量变化不大，但对照的表达量呈现先升后降的趋势，表明*MdPIN12*可能不响应IBA。

3　讨　论

植物不定根的形成和发育主要由基因型决定，同时受多种激素和环境因素的调节，其中生长素在

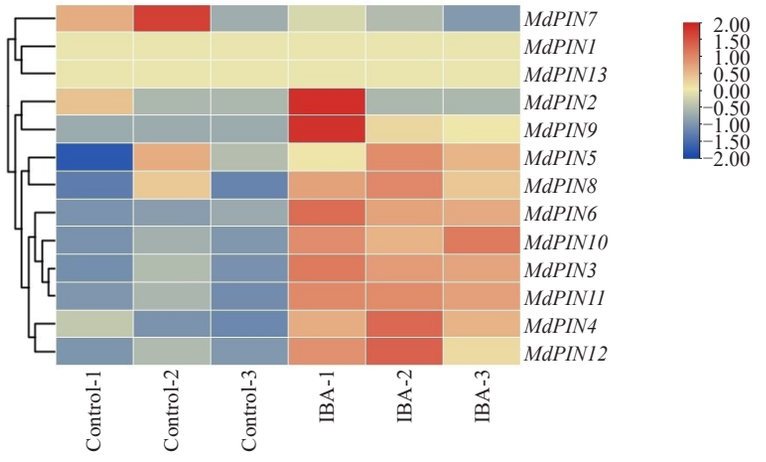

图 6 苹果 *PIN* 基因在 IBA 处理下转录组热图分析

Fig. 6 The heat map analysis of apple *PIN* gene family under IBA treatment

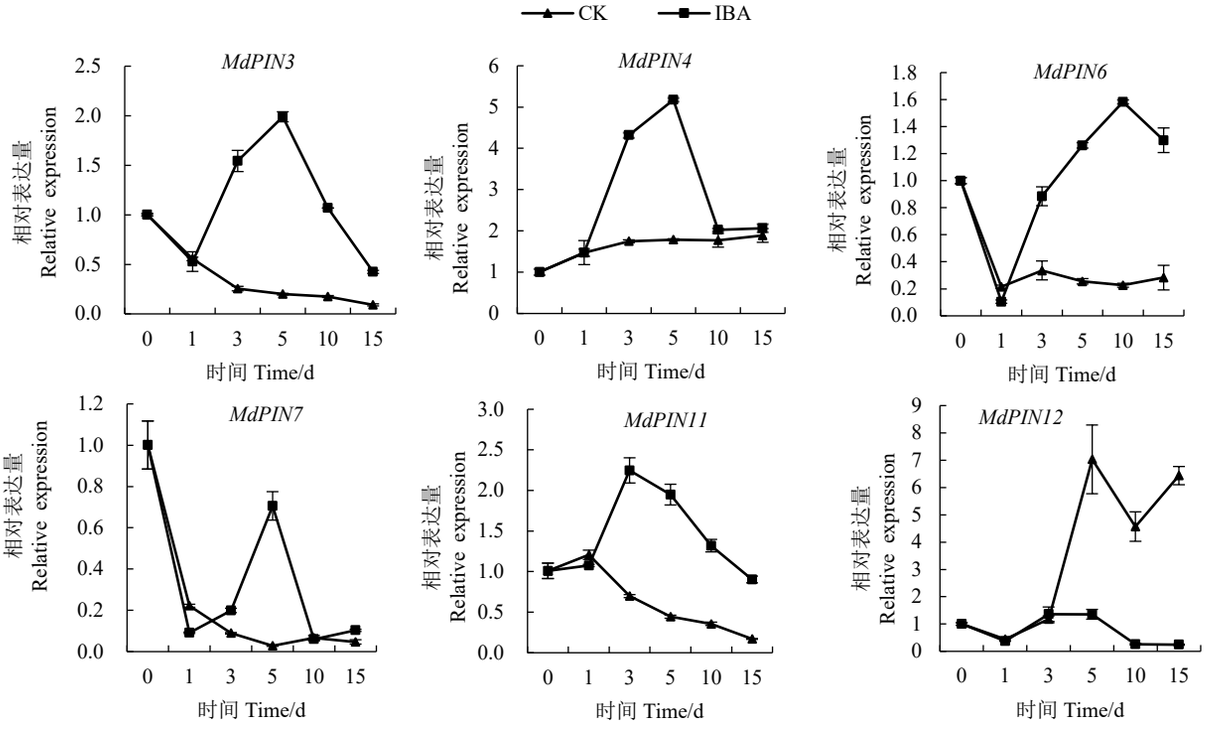

图 7 苹果 *PIN* 基因在 IBA 处理下的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of apple *PIN* gene under IBA treatment

不定根形成中起关键作用[2, 27]。PIN作为生长素极性运输载体在植物生长发育期起重要作用。许多研究表明*PIN*基因家族成员广泛地参与调控植物不定根的形成，并在不定根形成过程中起着重要的作用[10, 18]。笔者从苹果中鉴定出了13个苹果*PIN*基因，与刘小杰等[21]鉴定出的数量不一样，造成数量差异的原因可能是采用的苹果基因组数据库的版本和筛选的条件不同。研究发现不同植物中*PIN*家族包含的基因数量不同，其中烟草中最多，有29个[8]，拟南芥中最少，有8个[6]，不同植物*PIN*数量的差异可能是在进化过程中引起的[28]。苹果*PIN*家族成员的氨基酸序列长度存在较大差异，最小的是357 aa，最大的是660 aa，拟南芥*PIN*家族成员的氨基酸序列长度也在存在较大差异[29-31]。苹果*PIN*家族成员基因结构相似，都具有相同的8个motifs和5个CDS区。其中*MdPIN1*和*MdPIN2*基因结构更为相似，理化性状和跨膜结构也相似，暗示他们可能有相似的功能。

系统进化分析可以了解物种的亲缘关系和基因的功能，聚类关系越近，具有类似功能的可能性越大[32]。本研究中，对苹果、桃[4]、番茄[14]、玉米[9]和拟南芥[6]进行了系统进化分析。结果显示，PIN蛋白家族分成三类，苹果、番茄和拟南芥PIN蛋白集中在G1和G3亚家族上，而桃和玉米PIN蛋白在3个亚家族上都有分布。苹果和桃PIN蛋白序列的相似度更高，可能是两个物种的亲缘关系更近，同属于蔷薇科。G1亚家族中有3个苹果*PIN*基因，分别是*MdPIN1*、*MdPIN2*和*MdPIN7*。G2亚家族中没有苹果*PIN*基因，这可能是进化过程中发生了基因突变，产生了新的基因。在G3亚家族中包含了除G1亚家族外所有的苹果*PIN*基因。笔者还发现G3亚家族中有多对苹果*PIN*基因存在共线性关系，并且存在共线性关系的苹果*PIN*基因理化性质相似，在染色体上的位置也较近。在G3亚家族中包含了大部分拟南芥*PIN*基因，其中不少基因与根的生长有关。该亚家族中的其他物种的*PIN*基因也有相似的功能[33]。这些结果表明，苹果*PIN*基因可能与不定根的形成有关。顺式作用元件分析发现该家族启动子区域含有激素响应顺式作用元件，主要包括生长素、赤霉素、脱落酸响应元件。推测*PIN*家族成员中的生长素响应元件可能参与调控不定根的形成[34]。

基因的表达情况与其功能之间存在密切联系[35]。*PIN*基因的表达受多种植物激素的影响，包括生长素自身的诱导[36]。IBA被广泛应用于植物不定根的诱导。外源IBA显著提高拟南芥、绿豆、苹果等植物茎段外植体不定根的数量[36-38]。笔者以前的研究也表明IBA诱导苹果茎段不定根的形成[2]。本研究通过转录组对可能调控不定根形成的家族成员进行了初步筛选，分析发现苹果13个*PIN*家族成员中有8个显著受IBA的诱导，而对照处理下苹果*PIN*基因家族成员表达量变化不大。结合IBA处理不定根形成的表型分析，推测IBA可能通过诱导*MdPINs*基因的表达促进了不定根的形成。前人研究表明，不定根的诱导在不定根形成过程中起关键作用[33]，笔者筛选出表达差异较大的6个基因，用qRT-PCR进一步验证在不定根形成中的动态表达模式，发现4个*PIN*家族成员（*MdPIN3*、*MdPIN4*、*MdPIN6*和*MdPIN11*）受IBA诱导后显著上调表达，其中*MdPIN4*在第5天表达量是对照的2.9倍，推测*MdPIN4*在调控苹果砧木不定根形成中起着重要作用，但该基因的具体生物学功能及调控机制仍需要进一步研究。

4　结　论

从苹果基因组中鉴定得到13个苹果*PIN*家族成员，不均匀地分布于8条染色体上，其氨基酸长度在357~660 aa之间，蛋白质分子质量为38.84~71.61 ku，等电点在6.93~9.35之间。启动子作用元件分析表明，13个*PIN*启动子上含有与激素、生长和逆境响应相关的顺式作用元件，其中有8个基因含有生长素响应作用元件，暗示它们可能参与生长素调控不定根形成的过程。在13个*PIN*家族成员中，有6个基因在IBA处理下上调表达，其中*MdPIN4*表达量变化最大，推测*MdPIN4*在调控苹果砧木不定根形成中起着重要作用。

参考文献 References：

[1] 韦燕红，刘桢，李珂，孟媛，汪蕙，毛江萍，马豆豆，李少欢，马娟娟，卢显，张东 . 苹果 miR396 家族鉴定及在不定根发育过程中的表达分析[J]. 园艺学报，2020，47(7)：1237-1252.
WEI Yanhong，LIU Zhen，LI Ke，MENG Yuan，WANG Hui，MAO Jiangping，MA Doudou，LI Shaohuan，MA Juanjuan，LU Xian，ZHANG Dong. Genome-wide identification and expression analysis of miR396 family during adventitious root development in apple[J]. Acta Horticulturae Sinica，2020，47(7)：1237-1252.

[2] BAI T H，DONG Z D，ZHENG X B，SONG S W，JIAO J，WANG M M，SONG C H. Auxin and its interaction with ethylene control adventitious root formation and development in apple rootstock[J]. Frontiers in Plant Science，2020，11：574881.

[3] CHEN L H，CAI M L，CHEN M H，KE W Q，PAN Y R，HUANG J D，ZHANG J J，PENG C L. Genome-wide characterization of PIN auxin efflux carrier gene family in *Mikania micrantha*[J]. International Journal of Molecular Sciences，2022，23(17)：10183.

[4] 谭彬，杨丽萍，陈立川，冯玫侨，连晓东，魏鹏程，程钧，王小贝，冯建灿 . 桃 PIN 蛋白基因家族鉴定及其在不同树型桃中的表达分析[J]. 农业生物技术学报，2020，28(10)：1747-1760.
TAN Bin，YANG Liping，CHEN Lichuan，FENG Meiqiao，LIAN Xiaodong，WEI Pengcheng，CHENG Jun，WANG Xiaobei，FENG Jiancan. Identification and expression analysis of PIN gene family in different tree architectures of peach (*Prunus persica*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology，2020，28(10)：1747-1760.

[5] KUMAR M，KHERAWAT B S，DEY P，SAHA D，SINGH A，BHATIA S K，GHODAKE G S，KADAM A A，KIM H U，MANORAM A，CHUNG S M，KESAWAT M S. Genome-wide identification and characterization of PIN-FORMED (PIN) gene family reveals role in developmental and various stress condi-

tions in *Triticum aestivum* L.[J]. International Journal of Molecular Sciences，2021，22(14)：7396.

[6] GANGULY A，PARK M，KESAWAT M S，CHO H T. Functional analysis of the hydrophilic loop in intracellular trafficking of *Arabidopsis* PIN-FORMED proteins[J]. The Plant Cell，2014，26(4)：1570-1585.

[7] WANG J R，HU H，WANG G H，LI J，CHEN J Y，WU P. Expression of *PIN* genes in rice (*Oryza sativa* L.)：tissue specificity and regulation by hormones[J]. Molecular Plant，2009，2(4)：823-831.

[8] XIE X D，QIN G Y，SI P，LUO Z P，GAO J P，CHEN X，ZHANG J F，WEI P，XIA Q Y，LIN F C，YANG J. Analysis of *Nicotiana tabacum* PIN genes identifies $NtPIN_4$ as a key regulator of axillary bud growth[J]. Physiologia Plantarum，2017，160(2)：222-239.

[9] FORESTAN C，VAROTTO S. The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development[J]. Molecular Plant，2012，5(4)：787-798.

[10] HE P，ZHAO P，WANG L M，ZHANG Y Z，WANG X S，XIAO H，YU J N，XIAO G H. The PIN gene family in cotton (*Gossypium hirsutum*)：Genome-wide identification and gene expression analyses during root development and abiotic stress responses[J]. BMC Genomics，2017，18(1)：507.

[11] ZHANG C H，DONG W Q，HUANG Z A，CHO M，YU Q C，WU C Y，YU C L. Genome-wide identification and expression analysis of the *CaLAX* and *CaPIN* gene families in pepper (*Capsicum annuum* L.) under various abiotic stresses and hormone treatments[J]. Genome，2018，61(2)：121-130.

[12] LIU B B，ZHANG J，WANG L，LI J B，ZHENG H Q，CHEN J，LU M Z. A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns[J]. Journal of Experimental Botany，2014，65(9)：2437-2448.

[13] WANG Y Q，CHAI C L，VALLIYODAN B，MAUPIN C，ANNEN B，NGUYEN H T. Genome-wide analysis and expression profiling of the PIN auxin transporter gene family in soybean (*Glycine max*)[J]. BMC Genomics，2015，16：951.

[14] PATTISON R J，CATALÁ C. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/*LAX* gene families[J]. The Plant Journal，2012，70(4)：585-598.

[15] 刘士平，王璐，王继荣，薛艳红，寿惠霞 . 高等植物的 PIN 基因家族[J]. 植物生理学通讯，2009，45(8)：833-841.
LIU Shiping，WANG Lu，WANG Jirong，XUE Yanhong，SHOU Huixia. PIN gene family in higher plants[J]. Plant Physiology Communications，2009，45(8)：833-841.

[16] LEE H，GANGULY A，LEE R D，PARK M，CHO H T. Intracellularly localized PIN-FORMED8 promotes lateral root emergence in *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science，2020，10：1808.

[17] YUAN T T，XIANG Z X，LI W，GAO X，LU Y T. Osmotic stress represses root growth by modulating the transcriptional regulation of PIN-FORMED3[J]. The New Phytologist，2021，232(4)：1661-1673.

[18] SUN H W，TAO J Y，BI Y，HOU M M，LOU J J，CHEN X N，ZHANG X H，LUO L，XIE X N，YONEYAMA K，ZHAO Q Z，XU G H，ZHANG Y L. OsPIN1b is involved in rice seminal root elongation by regulating root apical meristem activity in response to low nitrogen and phosphate[J]. Scientific Reports，2018，8：13014.

[19] 武星，胡兴峰，陈佩珍，孙晓波，吴帆，季孔庶 . 马尾松 *PmPIN1* 基因的克隆及功能分析[J]. 林业科学，2020，56(3)：184-192.
WU Xing，HU Xingfeng，CHEN Peizhen，SUN Xiaobo，WU Fan，JI Kongshu. Cloning and functional analysis of *PmPIN1* gene from *Pinus massoniana*[J]. Scientia Silvae Sinicae，2020，56(3)：184-192.

[20] ZHANG H，AN H S，WANG Y，ZHANG X Z，HAN Z H. Low expression of *PIN* gene family members is involved in triggering the dwarfing effect in M9 interstem but not in M9 rootstock apple trees[J]. Acta Physiologiae Plantarum，2015，37(5)：104.

[21] 刘小杰，樊胜，李国防，檀鸣，默宁，马娟娟，张东，韩明玉 . 苹果全基因组 *PIN* 成员鉴定及 *MdPIN15* 的克隆和在腋芽萌发中的表达分析[J]. 园艺学报，2017，44(11)：2041-2054.
LIU Xiaojie，FAN Sheng，LI Guofang，TAN Ming，MO Ning，MA Juanjuan，ZHANG Dong，HAN Mingyu. Genome-wide identification of *PIN* gene family，cloning and expression analysis of *MdPIN15* during axillary bud burst in *Malus*[J]. Acta Horticulturae Sinica，2017，44(11)：2041-2054.

[22] 姚富文，王枚阁，宋春晖，宋尚伟，焦健，王苗苗，王昆，白团辉，郑先波 . 苹果 HSP90 家族基因鉴定及高温胁迫下的表达分析[J]. 园艺学报，2021，48(5)：849-859.
YAO Fuwen，WANG Meige，SONG Chunhui，SONG Shangwei，JIAO Jian，WANG Miaomiao，WANG Kun，BAI Tuanhui，ZHENG Xianbo. Identification and expression analysis of HSP90 gene family under high temperature stress in apple[J]. Acta Horticulturae Sinica，2021，48(5)：849-859.

[23] CHEN C J，CHEN H，ZHANG Y，THOMAS H R，FRANK M H，HE Y H，XIA R. TBtools：An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant，2020，13(8)：1194-1202.

[24] SUBRAMANIAN B，GAO S H，LERCHER M J，HU S N，CHEN W H. Evolview v3：A webserver for visualization，annotation，and management of phylogenetic trees[J]. Nucleic Acids Research，2019，47(W1)：270-275.

[25] LESCOT M，DÉHAIS P，THIJS G，MARCHAL K，MOREAU Y，VAN DE PEER Y，ROUZÉ P，ROMBAUTS S. PlantCARE，a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research，2002，30(1)：325-327.

[26] LIVAK K J，SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$

method[J]. Methods，2001，25(4)：402-408.

[27] PACURAR D I，PERRONE I，BELLINI C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting[J]. Physiologia Plantarum，2014，151(1)：83-96.

[28] VELASCO R，ZHARKIKH A，AFFOURTIT J，…，VIOLA R. The genome of the domesticated apple (*Malus* × *domestica* Borkh.)[J]. Nature Genetics，2010，42(10)：833-839.

[29] MRAVEC J，SKŮPA P，BAILLY A，HOYEROVÁ K，KŘEČEK P，BIELACH A，PETRÁŠEK J，ZHANG J，GAYKOVA V，STIERHOF Y D，DOBREV P I，SCHWARZEROVÁ K，ROLČÍK J，SEIFERTOVÁ D，LUSCHNIG C，BENKOVÁ E，ZAŽÍMALOVÁ E，GEISLER M，FRIML J. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter[J]. Nature，2009，459(7250)：1136-1140.

[30] DING Z J，WANG B J，MORENO I，DUPLÁKOVÁ N，SIMON S，CARRARO N，REEMMER J，PĚNČÍK A，CHEN X，TEJOS R，SKŮPA P，POLLMANN S，MRAVEC J，PETRÁŠEK J，ZAŽÍMALOVÁ E，HONYS D，ROLČÍK J，MURPHY A，ORELLANA A，GEISLER M，FRIML J. ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*[J]. Nature Communications，2012，3：941.

[31] SIMON S，SKŮPA P，VIAENE T，ZWIEWKA M，TEJOS R，KLÍMA P，ČARNÁ M，ROLČÍK J，DE RYCKE R，MORENO I，DOBREV P I，ORELLANA A，ZAŽÍMALOVÁ E，FRIML J. PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in *Arabidopsis*[J]. New Phytologist，2016，211(1)：65-74.

[32] 周喆，张彩霞，张利义，王强，李武兴，田义，丛佩华 . 苹果 *LysM* 基因家族的生物信息学及表达分析[J]. 中国农业科学，2014，47(13)：2602-2612.
ZHOU Zhe，ZHANG Caixia，ZHANG Liyi，WANG Qiang，LI Wuxing，TIAN Yi，CONG Peihua. Bioinformatics and expression analysis of the *LysM* gene family in apple[J]. Scientia Agricultura Sinica，2014，47(13)：2602-2612.

[33] GARAY-ARROYO A，ORTIZ-MORENO E，DE LA PAZ SÁNCHEZ M，MURPHY A S，GARCÍA-PONCE B，MARSCH-MARTÍNEZ N，DE FOLTER S，CORVERA-POIRÉ A，JAIMES-MIRANDA F，PACHECO-ESCOBEDO M A，DUBROVSKY J G，PELAZ S，ÁLVAREZ-BUYLLA E R. The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression[J]. The EMBO Journal，2013，32(21)：2884-2895.

[34] 刘玉飞，庞丹丹，李友勇，蒋会兵，陈林波 . 茶树 PIN 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 分子植物育种，2020，18(23)：7700-7710.
LIU Yufei，PANG Dandan，LI Youyong，JIANG Huibing，CHEN Linbo. Identification and expression analysis of PIN gene family in *Camellia sinensis*[J]. Molecular Plant Breeding，2020，18(23)：7700-7710.

[35] TIAN R Z，YANG Y，CHEN M H. Genome-wide survey of the amino acid transporter gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.)：identification，expression analysis and response to abiotic stress[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，162：1372-1387.

[36] LUDWIG-MÜLLER J，VERTOCNIK A，TOWN C D. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments[J]. Journal of Experimental Botany，2005，56(418)：2095-2105.

[37] NAG S，PAUL A，CHOUDHURI M. Changes in peroxidase activity during adventitious root formation at the base of mung bean cuttings[J]. International Journal of Scientific & Technology Research，2013，2：171-177.

[38] AHKAMI A H，MELZER M，GHAFFARI M R，POLLMANN S，JAVID M G，SHAHINNIA F，HAJIREZAEI M R，DRUEGE U. Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport，carbohydrate metabolism and adventitious root formation[J]. Planta，2013，238(3)：499-517.